

QUANTA Plex™ Celiac IgG Profile 708945

Para utilização em diagnóstico *In Vitro*

Complexidade CLIA: Elevada

Aplicação Diagnóstica

O QUANTA Plex™ Celiac IgG Profile é um imunoensaio de fluorescência para a detecção semi-quantitativa de auto-anticorpos os anticorpos da transglutaminase tecidual anti-humana da IgG (Imunoglobulina A) (h-tTG), e peptídeo de gliadina anti-desamidado (DGP) no soro humano. A presença destes anticorpos, juntamente com outras descobertas laboratoriais e clínicas, é uma ajuda no diagnóstico da enteropatia sensível ao glúten da doença celíaca. Este teste serve para proporcionar uma sensibilidade suplementar ao testar doentes com deficiência em IgA.

Resumo e Explicação do teste

A doença celíaca é uma condição crónica, cujas características principais incluem a inflamação e o esmagamento característico da mucosa intestinal, resultando numa síndrome de má absorção conhecida como uma enteropatia sensível ao glúten. A etiologia exacta da doença permanece desconhecida, à excepção da gliadina, fracção solúvel do álcool de glúten do trigo, que é claramente o agente tóxico.^{1,2}

recentemente, têm sido sugeridos testes sorológicos para anticorpos de anti-gliadina, anti-endomisial e anti-tTG para examinar os doentes com enteropatia sensível ao glúten, assim como para controlar a conformidade dietética.³⁻⁵ A Sociedade Europeia de Gastrenterologia e Nutrição Pediátrica recomendou a utilização de marcadores anticorpos, tais como os anticorpos da anti-gliadina e anti-endomisial para reduzir o número de biópsias necessárias para fazer um diagnóstico.⁵

As pessoas com doença celíaca têm uma maior prevalência de deficiência IgA selectiva do que a população geral,^{6,7} pelo que uma boa estratégia de testes serológicos inclui a medição de anticorpos IgA específicos e níveis IgA no soro total, ou medição de anticorpos IgA e IgG.^{3,6-9}

O antígeno endomisial identificou-se como a enzima de ligação cruzada com a proteína tTG.¹⁰ Os procedimentos específicos do ELISA integrando tTG como o antígeno proporcionam uma alternativa fiável e objectiva aos ensaios tradicionais por imunofluorescência utilizando finas secções de esófago de primata como substrato.¹⁰⁻¹² O antígeno h-tTG tem sido produzido por tecnologia recombinante, e pode ter certas vantagens comparando com o antígeno do fígado de porquinho-da-índia.^{11,12} Muitas pessoas com doença celíaca que tenham IgA suficiente não apresentam anticorpos IgG a h-tTG ou DGP. Muito que são IgA deficientes apresentam estes anticorpos. Numa análise da literatura, concluiu-se que 106 dos 108 (98%) pacientes com doença celíaca que tinham deficiência IgA selectiva eram positivos a IgG anti-tTG.¹³

Trabalhos recentes revelaram que os anticorpos da gliadina reactiva de doentes celíacos se ligam a um número muito limitado de epítomos específicos da molécula de gliadina.¹⁴⁻¹⁶ Além disso, estes estudos mostraram que a desamidação selectiva da gliadina pela enzima associada à doença celíaca, tTG, resulta numa ligação aumentada dos anticorpos anti-gliadina. Os ensaios que utilizam peptídeos de gliadina desamidados (DGPs) possuem uma maior precisão de diagnóstico para a doença celíaca, do que os ensaios anti-gliadina e mesmo até os anti-tTG.^{17,18} Adicionalmente, estes anticorpos são de interesse para acompanhar a actividade da doença ao longo do tempo e para controlar a adesão a uma dieta sem glúten.¹⁸

O QUANTA Plex™ Celiac IgG Profile é um teste de rastreio de anticorpos IgG anti-h-tTG e anti-DGP encontrados em pacientes com doença celíaca, particularmente os que têm uma deficiência IgA. Permite a detecção simultânea de anticorpos IgG, quer para um peptídeo de gliadina desamidado sintético quer para tTG humana recombinante e inclui uma esfera de controlo para detectar erro do operador.

Princípio do método

O h-tTG recombinante e o DGP sintético ligam-se a diferentes esferas, coloridas por fluorescência. As duas esferas revestidas por antígeno diferentes, assim como uma esfera revestida anti-IgG são misturadas em conjunto e colocadas em poços de uma placa de micropoços sob condições que conservam os antígenos no seu estado reactivo. Adicionam-se os controlos pré-diluídos, e soro de doentes diluídos a micropoços separados, permitindo que qualquer anticorpo DGP ou h-tTG presente se ligue aos antígenos imobilizados nas esferas, assim como liberta IgG para se ligar à esfera anti-IgG. De seguida, adiciona-se uma IgG anti-humana conjugada com uma sonda de fluorescência a cada micropoço. Uma segunda incubação permite ao conjugado IgG anti-humano fluorescente ligar-se a quaisquer anticorpos dos doentes que se ligam aos antígenos nas esferas ou são capturados pela esfera anti-IgG. As amostras são depois medidas no analisador de fluxo Luminex™. Este analisador 100 ou 200 (citómetro) de fluxo tem capacidade para separar a cor de cada esfera, assim como para medir a intensidade da fluorescência do conjugado em cada esfera.¹⁹ A intensidade da fluorescência na esfera é proporcional à quantidade de conjugado ligado, que por sua vez é proporcional à quantidade de anticorpos do doente, ligados às esferas revestidas por antígeno ou à esfera anti-IgA. Cada anticorpo pode ser semi-quantificado através da comparação da intensidade de fluorescência da amostra do doente com a intensidade do Calibrador correspondente. A esfera anti-IgG de controlo também se pode utilizar para assegurar que os resultados falsos negativos decorrentes de um erro operacional sejam detectados, como descrito no Controlo de Qualidade.

Reagentes

1. Placa de micropoços de poliestireno (azul/verde estampado na cor), 12 (1 x 8) tiras de micropoços com suporte, contendo esferas de 3 "cores" diferentes. Cada uma das esferas coloridas está revestida com um antígeno purificado diferente (h-tTG, DGP, anti-IgG), numa embalagem de folha de alumínio contendo exsiccantes
2. QUANTA Plex™ Negative Control, 1 frasco de tampão contendo conservante e soro humano sem anticorpos IgG humanos contra antígenos h-tTG e DGP, pré-diluído, 1,2mL
3. Celiac IgG Calibrator, 1 frasco de tampão contendo conservante e IgG anticorpos de soro humano contra os antígenos h-tTG e DGP, pré-diluído, 1,2mL
4. Celiac IgG Positive Control, 1 frasco de tampão contendo conservante e IgG anticorpos de soro humano contra os antígenos h-tTG e DGP, pré-diluído, 1,2mL
5. Diluente para Amostras HRP, 1 frasco de cor rosa, contendo solução salina com tampão Tris, Tween 20, estabilizadores proteicos e conservantes, 50mL
6. Conjugado IgG marcado com fluorescência (cabra), anti-IgG humana (f_c específica), 1 frasco castanho – pó liofilizado, contendo tampão, estabilizadores proteicos e conservantes. Consulte a secção de Métodos para as instruções de reconstituição

7. QUANTA Plex™ Conjugate Diluent, 1 frasco – de cor rosa, contendo tampão, estabilizadores proteicos e conservantes, 7mL

Advertências

1. ADVERTÊNCIA: Este produto contém um químico (0,02% cloranfenicol) no diluente da amostra considerado como cancerígeno no Estado da Califórnia.
2. Todo o material de origem humana utilizado na preparação dos controlos deste produto foi testado e deu resultados negativos para métodos aprovados pela FDA para anticorpos anti HIV, HBsAg e HCV. Contudo, nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência de HIV, HBV, HCV ou outros agentes infecciosos. Assim, QUANTA Plex™ Negative Control, e Celiac IgG Calibrator e Celiac IgG Positive Control devem ser manipulados como se fossem material potencialmente infeccioso.²⁰
3. A azida de sódio é utilizada como conservante. Este produto é venenoso e pode ser tóxico se for ingerido ou absorvido pela pele ou pelos olhos. A azida de sódio pode reagir com componentes de chumbo ou cobre das canalizações formando azidas metálicas explosivas. Por esta razão, ao deitar fora os restos de reagentes é necessário deixar correr água em quantidade abundante para evitar a formação destas substâncias.
4. Usar equipamento de protecção apropriado para trabalhar com os reagentes.
5. Os salpicos de reagentes devem ser limpos imediatamente. Observar todas as regulamentações ambientais nacionais e locais relativas à eliminação de resíduos.

Precauções

1. Utilizar somente para diagnóstico *In Vitro*.
2. A substituição de componentes do dispositivo por outros que não pertençam a este sistema pode originar resultados inconsistentes. Todos os controlos são específicos para o número de lote do kit.
3. A adaptação, total ou parcial, deste teste para processadores automatizados e outros aparelhos de processamento de líquidos pode dar origem a diferenças nos resultados obtidos nos testes por técnica manual. É da responsabilidade de cada laboratório garantir que o seu procedimento automático dá origem a resultados dentro dos limites aceitáveis.
4. Existem vários factores que influenciam o desempenho do ensaio. Entre estes inclui-se a temperatura inicial dos reagentes, a temperatura ambiente, a precisão e reprodutibilidade da técnica de pipetagem, a reprodutibilidade da técnica de mistura, o analisador de fluxo Luminex™ utilizado para ler os resultados e a duração dos tempos de incubação durante o ensaio. É necessária especial atenção à consistência para se obterem resultados rigorosos e reprodutíveis.
5. O protocolo deve ser criteriosamente respeitado.
6. Uma selagem inadequada da saqueta com tiras de micropoços e dessecantes pode provocar a degradação do antígeno e baixa precisão dos resultados.
7. Pode ser observada uma fluorescência inaceitavelmente baixa depois de múltiplas utilizações de um único frasco de conjugado de fluorescência durante algum tempo. É importante cumprir todos os procedimentos recomendados para manipulação dos conjugados fluorescentes, visando prevenir esta ocorrência.
8. A contaminação química do conjugado fluorescente pode resultar de uma limpeza ou lavagem inadequadas do equipamento ou instrumentos. Resíduos de substâncias químicas vulgares de laboratório tais como formalina, lixívia, etanol ou detergente irão provocar degradação do conjugado fluorescente no decurso do tempo. Lave exaustivamente todo o equipamento ou instrumentos com água destilada ou desionizada depois da utilização de desinfetantes/produtos de limpeza químicos.

Precauções particulares de conservação

1. Conservar todos os reagentes a 2-8° C. Não congelar. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando armazenados e manipulados conforme descrito no protocolo.
2. As tiras dos micropoços revestidas com antígenos que não forem logo utilizadas, devem ser seladas na embalagem protectora original com dessecantes e conservadas a 2-8° C.

Colheita da amostra

Este procedimento deve ser efectuado com uma amostra de soro. A adição de azida ou de outros conservantes às amostras do teste pode interferir negativamente nos resultados. As amostras de soro com contaminação bacteriana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Amostras ou soro muito hemolizados ou lipémicos devem ser evitados.

Após a colheita, o soro deve ser separado do coágulo. O documento H18-A3 da CLSI (anteriormente NCCLS) recomenda as seguintes condições de armazenamento para as amostras: 1) Não armazenar as amostras à temperatura ambiente durante mais de 8 horas. 2) Se o teste não for concluído num prazo de 8 horas, guardar a amostra a 2-8° C. 3) Se o teste não for concluído num prazo de 48 horas, ou se houver transporte da amostra, congelar a -20° C ou a uma temperatura inferior. As amostras congeladas devem ser bem agitadas depois de descongelarem e antes de serem testadas.

Procedimento

Material fornecido

- | | |
|---|--|
| 1 | Placa de micropoços de Celiac IgG Profile, (12-1 x 8 poços), (azul/verde estampado na cor) com suporte |
| 1 | 1,2 mL pronto a utilizar QUANTA Plex™ Negative Control, pré-diluído |
| 1 | 1,2 mL pronto a utilizar Celiac IgG Calibrator, pré-diluído |
| 1 | 1,2 mL pronto a utilizar Celiac IgG Positive Control, pré-diluído |
| 1 | 50 mL Diluente da amostra HRP |
| 1 | Conjugado IgG marcado com fluorescência (cabra), anti- IgG humana |
| 1 | 7 mL QUANTA Plex™ Conjugate Diluent |

Material adicional necessário mas não fornecido

Micropipetas de 5 e 500 µL
Pontas descartáveis para as micropipetas
Tubos de teste para diluições de amostras de doentes, volume de 1-4 mL
Água destilada ou desionizada
Fluido de preservação de fluxo analisador Luminex™ 100 ou 200

Analizador de fluxo Luminex™ 100 ou 200
Pipetador electrónico de 8 canais para a dispnesa de 5, 30, 45, 50 e 60µL ou dispositivo de pipetagem/diluição automatizado

Utilização do Analizador de Fluxo Luminex™ 100 ou 200

1. Consulte o manual do utilizador fornecido com o Luminex™ para instruções detalhadas sobre o funcionamento do analisador de fluxo Luminex™ e a Versão Sistema Integrado (IS) do programa de software do Luminex™ ou Versão 2,0 ou superior. Para mais informações e para a resolução de problemas com este ensaio, contacte a assistência técnica da INOVA Diagnostics, Inc. na morada ou número de telefone presentes na última página do Folheto Informativo. Seguem-se instruções resumidas para funcionamento do analisador de fluxo Luminex™.
2. Calibre o Luminex™ utilizando as esferas de Calibração e Controlo da fornecidas pela Luminex Corporation pelo menos uma vez por mês e confirme que a calibração tem sucesso. Para além disso, calibre o Luminex™ se a temperatura de calibração delta for superior a 3 graus, se os controlos do ensaio estiverem fora do intervalo ou conforme for necessário.
3. Luminex™ demora 30 minutos a aquecer depois de ter sido ligado. Quando o período de aquecimento se concluir, efectue as operações de purga, irrigação com álcool e lavagem recomendadas pelo fabricante.
4. Utilizar a Versão do software IS, carregue o modelo "Celiac IgG Profile" e assegure-se de que todas as informações de lote estão correctas. Se for necessário, actualize as informações do lote. Os parâmetros no modelo são os seguintes: As cores das esferas são h-tTG = 32, DGP = 33, anti- IgG = 42. Os eventos por esfera são 50, o tamanho da amostra para 50 µL, o débito para 60 µL/minuto (rápido) e o portão para aproximadamente 7500 a 17000, Utilizam-se os valores medianos para a Intensidade Média de Fluorescência (MFI).
5. Introduza os nomes da amostra manualmente, ou clicando em "Load Pa List".
6. Carregue a placa na plataforma XY do Luminex™.
7. Faça funcionar o Luminex™ clicando no botão "Start Plate".
8. Quando terminar o dia, execute as operações de sanear e embeber antes de desligar o instrumento.

Método: Antes de iniciar

1. Para programar informações para o equipamento automatizado, contacte a Assistência Técnica da INOVA Diagnostics, Inc.
2. Ligue o analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200, assegure-se de que aqueceu e efectue todas as operações de manutenção diárias conforme previamente descrito. Se for necessário, calibre o instrumento e confirme que a calibração teve sucesso.
3. Coloque todos os reagentes e amostras do doente à temperatura ambiente (20-26°C) e misture bem.
4. Se o conjugado fluorescente de anti- IgG humana não tiver sido reconstituído, adicione 6mL de QUANTA Plex™ Conjugate Diluent ao frasco castanho contendo o pó liofilizado e rode o recipiente durante aproximadamente 30 segundos para dissolver o conteúdo. O conjugado fluorescente reconstituído permanece estável durante 3 meses entre 2 e 8°C. **Não congele.**
5. Certifique-se de que o recipiente do fluido de preservação no Luminex™ está cheio de fluido de protecção disponível na Luminex Corporation e que o frasco de desperdícios está vazio.
6. Prepare uma diluição a 1:101 de cada amostra do doente adicionando 5µL de cada soro a 500µL de Diluente para Amostras HRP, e depois coloque no vórtice para misturar exaustivamente a solução. As amostras diluídas devem ser utilizadas no prazo de 8 horas depois da preparação. **NÃO DILUA** o QUANTA Plex™ Negative Control, o Celiac IgG Calibrator e o Celiac IgG Positive Control.
7. A determinação da presença ou ausência de anticorpos IgG anti-h-tTG e anti-DGP utilizando unidades arbitrárias, requer dois poços para o Calibrador e um poço para cada Controlo Negativo e Positivo. Recomenda-se a execução das amostras em singleto.

Técnica

1. **Todos os reagentes devem ser colocados à temperatura ambiente (20-26°C) antes de começar o ensaio.** Coloque o número necessário de micropoços/tiras no suporte. **Volte imediatamente a colocar as tiras não utilizadas no saco contendo exsiccantes e vede com firmeza para minimizar a exposição a vapor de água e luz.**
2. Adicionar 45µL de Diluente de Amostra HRP a cada micropoço que contenha uma **amostra do doente**. Não adicionar Diluente de Amostra HRP aos quatro primeiros micropoços, uma vez que estes contêm o QUANTA Plex™ Negative Control, O Celiac IgG Calibrator (em duplicado) e o Celiac IgG Positive Control. **Não** adicione as amostras dos doentes diluídas aos micropoços neste momento.
3. Mantenha um das seguintes sequências de coordenação quando adicionar controlos, amostras e conjugado ao micropoços. Em virtude das amostras serem lidas sucessivamente, a uma taxa de aproximadamente 1 amostra a cada 19 segundos (ou uma tira de 8 poços em aproximadamente 2½ minutos) pelo Luminex™, as amostras dos doentes e também o conjugado devem ser adicionados aos micropoços a esta taxa, para minimizar qualquer variação da frente para trás do ensaio. Se os controlos, amostras ou o conjugado forem adicionados um de cada vez, protele a adição destes ao próximo micropoço em 19 segundos. Se os controlos, amostras ou o conjugado forem adicionados 8 de cada vez a uma tira, protele cada adição à tira seguinte 2½ minutos. Estes dois esquemas de coordenação irão demorar aproximadamente 30 minutos para a adição de amostras a todas as 12 tiras de uma placa inteira e irão minimizar a variação da frente para trás do ensaio.
4. Submeter ao Vórtice, e depois adicionar 50µL de cada um dos controlos **pré-diluídos** seguintes: o QUANTA Plex™ Negative Controlno primeiro micropoço, o Celiac IgG Calibrator no segundo e no terceiro micropoços e o Celiac IgG Positive Control no quarto micropoço. Tem que ser utilizada uma pipeta electrónica quando se adicionarem manualmente as amostras e se misturarem as esferas. Utilize uma das sequências de coordenação para adicionar os controlos conforme descrito o passo 3. **Pipete vigorosamente pelo menos 30 µL do QUANTA Plex™ Negative Control, do Celiac IgG Calibrator e o Positive Control, para cima e para baixo quatro vezes, de modo a misturar as esferas e os controlos em cada micropoço** O tempo de incubação de 30 minutos inicia-se depois de adicionar o QUANTA Plex™ Negative Control ao **primeiro** micropoço.
5. Prossiga imediatamente com o ensaio adicionando 5 µL de soro do doente diluído nos restante micropoços adequados (nota: tal produz uma diluição final a 1:1010 do soro do doente). Mantenha a mesma sequência de coordenação utilizada no passo 4. **Misture a amostra do doente diluída e o HRP Diluente para Amostras no**

micropoço pipetando vigorosamente pelo menos 30 µL dos conteúdos do micropoço para cima e para baixo quatro vezes. Prossiga com a coordenação da incubação durante 30 minutos a partir do momento da adição do QUANTA Plex™ Negative Control. Coloque a tira de micropoços à temperatura ambiente, numa superfície nivelada e afastada da luz solar directa durante o resto do período de incubação.

6. No final do primeiro período de incubação, adicione 50 µL do conjugado fluorescente a cada micropoço e **pipete vigorosamente pelo menos 60 µL do conteúdo do micropoço para cima e para baixo quatro vezes.** Para adicionar o conjugado, mantenha a mesma sequência de coordenação utilizada nos passos 4 e 5. O conjugado deve ser removido do frasco em condições assépticas padrão e utilizando boas técnicas de laboratório. Retire apenas do frasco a quantidade de conjugado necessária para o ensaio. **PARA EVITAR POTENCIAL CONTAMINAÇÃO MICROBIANA E/OU QUÍMICA, NUNCA VOLTE A COLOCAR CONJUGADO NÃO UTILIZADO NO FRASCO.** Incube as tiras de micropoços durante 30 minutos à temperatura ambiente, numa superfície nivelada e afastada da luz solar directa. O período de incubação inicia-se depois da **primeira** adição do conjugado.
7. No prazo de uma hora depois da conclusão da incubação de 30 minutos do conjugado fluorescente, leia a placa de Celiac IgG Profile no Luminex™ conforme detalhado na secção acima, “Utilização do Analisador de Fluxo Luminex™ 100 ou 200”.

Controlo de qualidade

- O Celiac IgG Calibrator (em duplicado), o Celiac IgG Positive Control, o QUANTA Plex™ Controlo Negativo devem executar-se com uma série de amostras para assegurar que todos os reagentes e procedimentos foram realizados adequadamente.
- Note que o Celiac IgG Calibrator, o Celiac IgG Positive Control e o QUANTA Plex™ Negative Control estão pré-diluídos, pelo que não controlam os procedimentos associados às diluições de amostras.
- Outros controlos podem ser testados de acordo com as directivas ou requerimentos locais e/ou nacionais ou de acordo com as disposições de organizações acreditadas. Outros controlos adequados podem ser preparados efectuando alíquotas de amostras de soro humano e conservando a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
- Para se considerar válidos os resultados do teste, tem de se cumprir todos os critérios abaixo listados. Se não se cumprir algum deles, deve considerar-se o teste inválido e repetir o ensaio. O valor, em Unidades Luminex (UL) do Calibrador para cada antigénio encontra-se no rótulo da caixa para esse kit. Consulte a fórmula na secção de Cálculo dos Resultados para determinar as UL do QUANTA Plex™ Negative Control e dos Celiac IgG Positive Control.
 - O valor do QUANTA Plex™ Negative Control tem de ser < 20 UL para h-tTG e DGP. Tem de ser entre 10 e 50 UL, tanto para as esferas de controlo para as anti-IgG.
 - O valor do Celiac IgG Positive Control tem de ser ≥ 30 UL para h-tTG e entre 30 UL e 130 UL para DGP. Tem de ser entre 10 e 50 UL, tanto para as esferas de controlo para as anti-IgA.
 - A esfera de controlo anti-IgG destina-se a assegurar que os resultados falsos negativos do doente decorrentes de erros operacionais sejam detectados. Se a esfera de controlo anti-IgG tiver um resultado calculado inferior a 3 UL para qualquer doente em particular, na versão IS 2.0 e superior aparecerá um resultado de Novo Teste. Existe a possibilidade de que o soro e/ou conjugado de um paciente não tivesse sido adicionado ao poço. O paciente deve ser testado novamente para confirmar o resultado negativo.
- QUANTA Plex™ Negative Control, O Celiac IgG Calibrator e Celiac IgG Positive Control para monitorizar falhas substanciais dos reagentes. O utilizador deve recorrer ao documento C24-A3 da CLSI ((anteriormente NCCLS) para obter instruções suplementares sobre as práticas do Controlo de Qualidade apropriadas.
- Se se desejar, pode testar-se um poço com diluente da amostra mas sem soro para confirmar se a esfera de controlo anti-IgG detectará um poço sem soro. Este controlo isento de soro deve ser $< 3,0$ UL na esfera Anti-IgG e negativo em todas as outras esferas.

Cálculo dos resultados

As MFI para todos os controlos e amostras do doente para cada antigénio e as esfera de controlo determinam-se em primeiro lugar. A reactividade, em UL, de uma determinada amostra para cada tipo de antigénio pode ser depois calculada através da fórmula que se segue. Divida a MFI da amostra pela MFI do Celiac IgG Calibrator para esse antigénio ou esfera de controlo e multiplique o resultado pelo número de ULs atribuídas ao Celiac IgG Calibrator para esse antigénio. A UL valor do Calibrador para cada antigénio encontra-se no rótulo da caixa para esse lote do kit. O exemplo seguinte destina-se a determinar a reactividade anti-h-tTG. Utilize a fórmula equivalente para a esfera DGP e para as esfera de controlo.

$$\text{Valor da amostra (em UL)} = \frac{\text{MFI da Amostra para h-tTG}}{\text{MFI h-tTG Calibrator}} \times \text{Valor do h-tTG Calibrator (em UL)}$$

A reactividade do anticorpo em IgG para h-tTG e DGP pode então classificar-se de acordo com a tabela abaixo.

	UL
Negativa	< 20
Positiva fraca	20-30
Positiva	> 30

A reactividade está relacionada com a quantidade de auto-anticorpo presente na esfera, de forma não linear. Embora aumentos e diminuições das concentrações de anticorpos dos doentes se reflectam num aumento ou diminuição correspondentes da reactividade da fluorescência, a alteração não é proporcional (ou seja, uma duplicação da concentração de anticorpos não se reflecte numa duplicação da reactividade). Para além disso, a quantidade total de IgG no soro de um doente afecta a MFI determinada. Caso seja necessária uma quantificação mais rigorosa dos auto-anticorpos do doente, a amostra deve ser submetida a um teste quantitativo.

Interpretação dos resultados

A QUANTA Plex™ Assay consiste numa técnica extremamente sensível e tem capacidade para detectar pequenas diferenças em populações de doentes. Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo do normal com base nas suas técnicas, controlos, equipamento e população de doentes, de acordo com os seus procedimentos

estabelecidos.
Sugere-se que os resultados reportados pelo laboratório devam incluir a declaração: “Os resultados que se seguem foram obtidos com o INOVA QUANTA Plex™ Celiac IgG Profile. Valores obtiveram com métodos de ensaio de outros fabricantes não podem ser utilizados em substituição. A magnitude dos níveis de auto-anticorpos IgG reportados nem sempre pode estar correlacionada com um título de parâmetro de avaliação final.”

Limitações do método

- 1. A presença de imuno complexos ou de outros agregados de imunoglobulinas na amostra do doente podem causar um aumento do nível de ligação não-específica e produzir resultados falsos positivos neste ensaio.
- 2. Nem todos os doentes com doença celíaca h-tTG ou DGP IgG antibodies positivos.
- 3. Os resultados deste ensaio devem ser utilizados em conjunto com as conclusões clínicas e outros testes serológicos.
- 4. Não agitar adequadamente os controlos e/ou as amostras de soro diluidas, com as microesferas conservados na placa, pode aumentar os valores de %CV, em relação aos valores tipicos encontrados nos testes ELISA.
- 5. Depois da meia-hora de incubação com o conjugado fluorescente, ocorre um aumento de fluorescência de aproximadamente 10% por cada meia hora adicional ao tempo de incubação.
- 6. As características de desempenho do ensaio não foram determinadas para outras matrizes além do soro.
- 7. O desempenho deste ensaio não foi determinado para a população pediátrica.
- 8. A falha na manutenção dos tempos de adição dos reagentes pode provocar um aumento “Front-to-back” das variações dos testes.

Valores esperados

A capacidade do teste QUANTA Plex™Celiac IgG Profile assay para detectar anticorpos anti-h-tTG e anti-DGP foi avaliada mediante comparação com testes ELISA disponíveis no mercado, comercializados pela INOVA Diagnostics, Inc. Os resultados do ELISA e de cada um dos testes de QUANTA Plex™ Celiac IgG Profile foram considerados positivos se a amostra do doente foi igual ou superior a 20 Unidades Luminex ou Unidades ELISA e negativos se foram inferiores a 20 UL ou EU.

Intervalo de valores normais

278 amostras de dadores de sangue saudáveis no teste QUANTA Plex™ Celiac IgG Profile. Tudo 278 (100%) foram negativas na parte h-tTG do teste QUANTA Plex™. A amostra mais elevada apresentou um valor de 7 UL. O valor médio foi de 2,1 UL com um desvio padrão (DP) de 1,2, colocando o cut-off 14,7 DP acima da média. Todas, à excepção de 1 das 278 amostras normais (99,6%), foram negativas na porção de DGP do teste de QUANTA Plex™ Celiac IgG Profile. A amostra mais elevada apresentou um valor de 23 UL e foi também positiva no IgG DGP ELISA. Incluindo a amostra duplamente positiva, o valor médio foi de 1,9 UL com um DP de 1,9. O cutoff foi de 9,4 DP acima da média.

Sensibilidade e Especificidade

Para determinar a sensibilidade clínica dos testes de auto-anticorpos, foram testadas 5 amostras dos pacientes celíacos com deficiência IgA, o grupo principal deste teste pretende ajudar ao diagnóstico, no QUANTA Plex™ Celiac IgG Profile e correspondentes ELISAs, ver Tabela 1 abaixo. A sensibilidade do IgG anti-DGP e anti-h-tTG foi de 100% e 80%, respectivamente. Também foram testados mais 29 pacientes com doença celíaca com IgA suficiente que tinham uma dieta com glúten, bem como 32 pacientes celíacos numa dieta sem glúten. A porção DGP mostrou uma sensibilidade de 59% e 12%, respectivamente, enquanto a porção h-tTG mostrou uma sensibilidade de 14% e 3% para estes grupos, semelhante à sensibilidade do dispositivo implicado. Para determinar a especificidade clínica, testaram-se 487 doentes que não foram diagnosticados com a doença celíaca. Este grupo incluiu dadores de sangue normais, familiares de pacientes com doença celíaca, pacientes com doenças reumáticas, hepáticas, gastrintestinais e infecciosas e pacientes com quantidades definidas de IgA total A especificidade de IgG anti-DGP e anti-h-tTG nos dadores da sangue normal foi de 99,6% e 100% respectivamente (ver tabela abaixo).

Tablea 1. A Sensibilidade e a Especificidade Clínica de QUANTA Plex™ Celiac IgG Profile

		Gliadin II IgG ELISA	DGP IgG Luminex	h-tTG IgG ELISA	h-tTG IgG Luminex
Grupo de doentes	# doentes	# Positivo (%)	# Positivo (%)	# Positivo (%)	# Positivo (%)
Celíaco com deficiências IgA	5	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)
Celíaco, Dieta com glúten	29	19 (66%)	17 (59%)	2 (7%)	4 (14%)
Celíaco, Dieta sem glúten	32	6 (19%)	4 (12%)	0 (0%)	1 (3%)
Outro Doenças *	191	4 (2,1%)	3 (1,6%)	1 (0,5%)	2 (1,0%)
Familiares de 1º grau	18	1 (5,6%)	1 (5,6%)	0 (0%)	0 (0%)
Dadores de Sangue Saudáveis	278	3 (1,1%)	1 (0,4%)	0 (0%)	0 (0%)

*Inclui pacientes com níveis de IgA definidos e doenças reumáticas, hepáticas, gastrintestinais e infecciosas.

Comparação entre os Ensaios QUANTA Plex™ e ELISA

Calculou-se a percentagem total de concordância positiva, negativa (com Intervalos de Segurança de 95%) dos ensaios anticorpos do QUANTA Plex™ comparada com os ELISAs para todas as amostras testadas e apresentada nas tabelas abaixo.

h-tTG IgG		ELISA		
		Positivo	Negativo	Todo
Luminex	Positivo	28	29*	57
	Negativoe	6**	891	897
	Totdo	34	920	954

*Vinte e quatro destas amostras eram positivas a, pelo menos, dois dos outros três marcadores serológicos (IgA anti-h-tTG, IgA anti-DGP ou IgG anti-DGP). Duas amostras só foram positivas a h-tTG IgA a 50 e 96 EU. Uma amostra é um paciente com doença celíaca que é IgA deficiente. As duas amostras restantes foram não positivas a qualquer outro marcador serológico DC testado e não têm diagnóstico.

**Três destas amostras são conhecidas como falso-positivo no h-tTG IgG ELISA. Duas amostras eram negativas numa maioria de outros marcadores serológicos (IgA anti-h-tTG, IgA anti-DGP e IgG anti-DGP) e não eram IgA deficientes. A amostra final é um paciente com doença celíaca, que é positiva a IgA anti-h-tTG e anti-DGP.

Concordância de percentagem de positivos: 28/(28+6)x100 = 82,4% (66-93%)
Concordância de percentagem de negativos: 891/(29+891)x100 = 96,8% (96-98%)
Concordância de percentagem global: (28+891)/(28+29+6+891)x100 = 96,3%

DGP IgG		ELISA		
		Positivo	Negativo	Todo
Luminex	Positivo	133	4*	137
	Negativo	20**	797	817
	Totdo	153	801	954

*Três destas amostras restantes foram não positivas a qualquer outro marcador serológico DC testado e não têm diagnóstico. Uma amostra é uma amostra de painel de pacientes QC ELISA inicialmente diluída que é positiva a IgA anti-h-tTG e anti-DGP.

**Oito destas amostras foram negativas para uma maioria de todos os outros marcadores serológicos DC testados. Desses 8, dois eram doadores de sangue normais, 5 não tinham diagnóstico e 1 é um paciente DC numa dieta sem glúten. Das restantes 12 amostras, a maior parte era inferior a 25 EU no DGP IgG ELISA, com a mais elevada a ser de 36 EU.

Concordância de percentagem de positivos: 133/(133+20)x100 = 86,9% (81-92%)
Concordância de percentagem de negativos: 797/(4+797)x100 = 99,5% (99-100%)
Concordância de percentagem global: (133+797)/(133+4+20+797)x100 = 97,5%

Precisão e Reprodutibilidade

Variação intra-ensaio e variação inter-ensaio. Para a variação intra-ensaio, ensaiaram-se 18 amostras 10 vezes cada num único ensaio. Na tabela abaixo lista-se a variação de 5 amostras representativas para cada teste. Para a variação inter-ensaios, analisaram-se 22 amostras em 6 testes executados em 6 dias diferentes. Na tabela abaixo lista-se a variação de 5 amostras representativas para cada teste.

Variação intra-ensaio			Variação inter-ensaios		
Antígeno	Média LU	% C.V.	Antígeno	Média LU	% C.V.
h-tTG	153	5%	h-tTG	169	12%
h-tTG	26	6%	h-tTG	30	17%
h-tTG	111	5%	h-tTG	117	7%
h-tTG	39	7%	h-tTG	39	14%
h-tTG	44	8%	h-tTG	45	10%
DGP	54	6%	DGP	58	14%
DGP	50	4%	DGP	51	7%
DGP	24	5%	DGP	24	7%
DGP	21	6%	DGP	21	9%
DGP	119	5%	DGP	130	11%

Referências

1. Trier JS. Celiac Sprue. N Engl J Med **325**: 1709-1719, 1991.

2. Strober W. Gluten-sensitive enterophy: A nonallergic immune hypersensitivity of the gastrointestinal tract. J. Allergy Clin. Immunol. **78**: 202-211,1986.

3. McMillan SA, Haughton DJ, Biggart JD, et al. Predictive value for coeliac disease of antibodies to gliadin, endomysium and jejunum in patients attending for jejunal biopsy. BMJ **303**:1163-1165, 1991.

4. Valdimarsson T, Franzen L, Grodzinsky E, et al. Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected celiac disease and IgA anti-endomysial antibodies? 100% positive predictive value for celiac disease in adults. Digestive Diseases and Science **41**: 83-87, 1996.

5. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. Revised criteria for diagnosis of celiac disease: Report of working group of Eurorpean Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN). Arch Diseases of Childhood **65**: 909-911, 1990.

6. Collin P, Maki M, Keyrilainen O, et al. Selective IgA deficiency and coeliac disease. Scand J Gastroenterol **27**: 367-371, 1992.

7. Cataldo F, Marino V, Ventura A, et al. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Gut **42**:362-365, 1998.

8. Fernandez E, Blanco C, Garcia S, et al. Use of low concentrations of human IgA anti-tissue transglutaminase to rule out selective IgA deficiency in patients with suspected celiac disease. Clin Chem **51**, 1014-1016, 2005.

9. Dahlbom I, Olsson M, Forooz NK, et al. Immunoglobulin G (IgG) anti-tissue transglutaminase antibodies used as markers for IgA-deficient celiac disease patients. Clin Diag Lab Immunol **12**:254-258, 2005.

10. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine* 3: 797-801, 1997.
11. Sardy M, Odenthal U, Karpatis S, et al. Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *Clin Chem* 45: 2142, 1999.
12. Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, et al. Human recombinant tissue transglutaminase ELISA : an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterology* 95: 1253-1257, 2000.
13. Villalta D, Alessio MG, Tampoia M, et al. Diagnostic accuracy of IgA anti-tissue transglutaminase antibody assays in Celiac disease patients with selective IgA deficiency. *Ann NY Acad Sci* 1109: 212-220, 2007.
14. Osman AA, Günzel T, Dietl A, et al. B-Cell epitopes of gliadin. *Clin Exp Immunol* 121: 248-254, 2000.
15. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, et al. Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin Chem* 47: 2023-2028, 2001.
16. Schwertz E, Kahlenberg F, Sack U, et al. Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. *Clin Chem* 50: 2370-2375, 2004.
17. Prince HE. Evaluation of the INOVA diagnostics enzyme-linked immunosorbent assay kits for measuring serum immunoglobulin G (IgG) and IgA to deamidated gliadin peptides. *Clin Vaccine Immunol* 13:150-151, 2006.
18. Sugai E, Vazquez H, Nachman F, et al. Accuracy of testing for antibodies to synthetic gliadin-related peptides in celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 1112-1117, 2006.
19. Martins TB, Burlingame R, von Muhlen CA, et al. Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:1054-1059, 2004.
20. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institutes of Health, Fifth Edition, 2007.

Fabricado por:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Representante Autorizado:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

Technical Service
628945

888-545-9495
March 2008
Revision PRT0

